

English translation of the relevant part of **JP-A-54-138115**

Publication date: **October 26, 1979**

"The present invention relates to an anticancer agent containing a novel yeast glucan as an effective component.

More particularly, the present invention relates to the anticancer agent containing the yeast glucan which is soluble in hot water at a temperature of 75°C or higher and in alkali solutions of pH 9.5 or greater, but not soluble in water.

The yeast glucan maintains its effectiveness as an anticancer agent even in the form of a water-soluble carboxy alkyl derivative."

⑨日本国特許庁(JP)

⑪特許出願公開

⑫公開特許公報(A)

昭54-138115

⑬Int. Cl.²
A 61 K 35/72

識別記号 ⑭日本分類
ADU 30 A 32
30 H 52

庁内整理番号 ⑮公開 昭和54年(1979)10月26日
6617-4C

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑯制癌剤

⑰特 願 昭53-45143
⑱出 願 昭53(1978)4月17日
⑲発 明 者 北村 勲平
高崎市石原町3703番地の5

⑲発 明 者 白須由治
高崎市宮原町11番地 B-404
⑳出 願 人 麒麟麦酒株式会社
東京都渋谷区神宮前6丁目26番
1号
㉑代 理 人 弁理士 猪股清 外2名

明 細 書

発明の名称 制 癌 剤

特許請求の範囲

1. 下記の物性値で特定される熱水およびアルカリ水溶液に可溶かつ水に不溶の酵母グルカンを含む成分とする、制癌剤。

(1)元素分析

| | |
|----|--------|
| C | 39.1 % |
| H | 5.7 % |
| O | 54.9 % |
| 灰分 | 0.3 % |

(2)分子量

ゲル浸透法による平均分子量は50,000～120,000である。

(3)融点(分解点)

一般に多糖類にあつては融点は認められないが、270℃付近で完全に炭化する。

⑳比旋光度

$(\alpha)_D^{25} = -20 \sim -14^\circ$ (C=0.5%、ジメチルスルホキシド中)

(㉑)紫外線吸収スペクトル

著名な吸収は認められない(第1図)。

(㉒)赤外線吸収スペクトル

890 cm^{-1} にβ-型のグリコシド結合に特有な吸収が認められる(第2図)。

(㉓)溶剤に対する溶解性

常温の水に不溶。熱水(75℃以上)に可溶。アルカリ水溶液(pH 9.5以上)に可溶。メタノール、エタノール、エーテルおよびアセトンに不溶。ジメチルスルホキシドに可溶。90%硫酸に可溶。

(㉔)呈色反応

アンスロン反応、モーリッシュ反応に対して陽性。

ニンヒドリン反応、ビクレット反応、キサントプロテイン反応、エルマン・モルガン反応、ジフェニルアミン反応に対して陰性。

(字訂正)

(9)塩基性、酸性、中性の別

水懸濁液は中性。

(10)物質の色

白色。

(11)糖の組成

100%グルコースよりなる。

(12)糖の結合様式

β -1,3-グルカナーゼにより分解されることから、主として β -1,3-グルコシド結合である。

(13)特異的性質

本物質の水性懸濁液を75℃以上に加熱すると懸液となり、これを冷却するとゲル化凝固する。ゲル化は熱可逆的である。

2. 酵母グルカンが水溶性のカルボキシアルキル誘導体の形である、特許請求の範囲第1項記載の制癌剤。

発明の詳細な説明

(1)発明の背景

い」とされている(前記「蛋白質、核酸、酵素」第15巻、1464頁、1970年、参照)。このような酵母グルカンも強アルカリ加熱処理すると水に可溶性のものとなるものようである(特公昭47-15712号公報参照)。そのような激しい処理にすれば酵母グルカンはかなりの変性を受けていると考えられる。

一方、 β -1,3-グルコシド結合を主体とする多糖の他の例として、カードランがある(「高分子」第16巻、1197頁、1967年)。カードランは加熱凝固性であつて、その水懸濁液を加熱することによつてゲル化し、そのゲルは熱不可逆性を有している。

ある種の細菌の培養によつて寒天様多糖が生産されることが知られている(特公昭52-12798号公報)。しかし、その場合の多糖はグルカンではないばかりではなく水溶性である。

最近に判り、酵母菌体を低濃度の担子菌由来酵母細胞膜溶解酵素で処理したのち、菌体から熱水抽出法により高粘度多糖類を分離抽出したことが

技術分野

本発明は、新規な多糖を有効成分とする制癌剤に関する。さらに具体的には、本発明は、新規な酵母グルカンを有効成分とする制癌剤に関する。

先行技術

酵母菌体より化学的処理によつて酵母グルカンを調製する方法は公知である(たとえば、「ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイエティー」(Journal of Chemical Society) 3862頁、1958年、および、「蛋白質、核酸、酵素」第15巻、1463頁、1970年)。この場合の化学的処理は主としてアルカリ水溶液による酵母菌体の処理からなり、アルカリ可溶性部分を溶解除去して残存するグルカンを回収するという原理にたつところから、得られる酵母グルカンはアルカリ水溶液に不溶であると共に常温の水にも熱水にも不溶の物質である。従つて、酵母グルカンの性質として、「酵母グルカンは β -1,3-グルコシド結合を主体とする多糖で、ヨードで呈色しない。他の多糖とは異なり、水にもアルカリにも溶けな

報告された(日本農芸化学会昭和53年度大会講演要旨集、第92頁(講演番号2H-4))。報告されたところによればこの多糖はグルカンを主成分とするものであるとことであり、また高粘度多糖類とされているところから、この多糖は水溶性であることが示唆される。

ある種の酵母グルカンが制癌作用を有することは公知である(キャンサー・リサーチ(Cancer Research)、第23巻、201頁、(1963))。また、前記の水溶性グルカン(特公昭47-15712号公報)も抗腫瘍性を有するとされている。さらにまた、酵母からの水溶性マンナンが制癌作用を有することも知られている(抗腫瘍病研究雑誌、第24巻、第4号、307頁(1972))。

一方、担子菌由来のグルカンを α -ハロゲン置換脂肪酸またはその誘導体と反応させて、水溶性かつ抗腫瘍性のカルボキシアルキル化グルカンを製造することが知られている(特公昭48-37590号公報、前記抗腫瘍病研究雑誌)。

(I) 発明の概要

要旨

本発明は、新規な酵母グルカンを有効成分とする制癌剤に関する。

すなわち、本発明による制癌剤は、75℃以上の熱水に可溶、pH 9.5以上のアルカリ水溶液に可溶および水に不溶の酵母グルカンを有効成分とするものである。

下記の特性値で特定される熱水およびアルカリ水溶液に可溶かつ水に不溶の酵母グルカンを有効成分とするものである。

この酵母グルカンは水溶性のカルボキシアルキル誘導体の形であつても制癌作用を有する。

効果

本発明で有効成分とする酵母グルカンが新規物質であるところより、その制癌作用も未知であつた。この酵母グルカンが制癌作用を有するということは予測可能なことではない。例えらば、グルカン、特にβ-1, 3-グルカンであつても制癌作用を持たないものがいくつも存在するからで

(3) 融点(分解点)

一般に多糖類にあつては融点は認められないが、270℃付近で完全に炭化する。

(4) 比旋光度

$[\alpha]_D^{20} = 20 \sim -14^\circ$ (C = 0.5%, ジメチルスルホキシド中)

(5) 紫外線吸収スペクトル

著名な吸収は認められない(第1図)。

(6) 赤外線吸収スペクトル

890 cm⁻¹ にβ-型のグリコセリド結合に特有な吸収が認められる(第2図)。

(7) 溶剤に対する溶解性

常温の水に不溶。熱水(75℃以上)に可溶。アルカリ水溶液(pH 9.5以上)に可溶。メタノール、エタノール、エーテルおよびアセトンに不溶。ジメチルスルホキシドに可溶。90%硫酸に可溶。

なお、本発明酵母グルカンの水に対する溶解度の温度依存性は、下記の通りである。これは、本発明酵母グルカンの0.5%水懸

特開昭54-138115(3)

ある(たとえばパキマン(ネイチャー(Nature)、第225巻、第5236号、943頁(1970)参照))。

本発明で対象とする酵母グルカンは熱水可溶という特異的な性質を有するが、常温の水には不溶である。このような酵母グルカンをその水溶性カルボキシアルキル誘導体に変換しても、この酵母グルカンの制癌作用は維持される。

(II) 発明の具体的な説明

1. 酵母グルカン

本発明による酵母グルカンは、精製したものの(詳細後記)について下記の性質を有する。

(1) 元素分析

| | |
|----|-------|
| C | 39.1% |
| H | 5.7% |
| O | 54.9% |
| 灰分 | 0.3% |

(2) 分子量

ゲル浸透法による平均分子量は50000 ~ 120,000である。

濁液を下記の各温度で10分間保持して、グルカンの溶解性を検討して得たものである。

| 温度(℃) | 溶解性* |
|-------|--------|
| 65 | - |
| 70 | - |
| 75 | + |
| 80 | ++ |
| 85 | ++ |
| - | 不溶 |
| + | かすかに溶解 |
| ++ | 完全に溶解 |

また、本発明酵母グルカンの水に対する溶解度のpH依存性は下記の通りである。これは、下記のpHの濁液に0.5%になるように本発明酵母グルカンを懸濁させて攪拌し、室温3時間放置後、遠心分離により固液分離し、上澄液の糖含量をフェノール-硫酸法により測定して得たものである。

| pH | 溶解度(%) |
|------|--------|
| 12.0 | 100 |
| 11.0 | 74 |
| 10.5 | 10 |
| 10.0 | 2 |
| 9.5 | 1 |
| 9.0 | 0 |
| 8.5 | 0 |
| 8.0 | 0 |
| 7.0 | 0 |

(8) 呈色反応

アンスロン反応、モーリッシュ反応に対して陽性。

ニンヒドリン反応、ピウレット反応、キサントプロテイン反応、エルソンモルガン反応、ジフェニルアミン反応に対して陰性。

(9) 塩基性、酸性、中性の別

水懸濁液は中性。

(10) 物質の色

白色。

収スペクトルを模写したものである。

2. 酵母グルカンの調製

(1) 原料

酵母細胞膜を有する原料が一般に使用される。酵母細胞膜原料の一例は酵母菌体であり、他の一例は酵母の有価物抽出残液である。抽出残液には、酵母エキス抽出残液、核糖抽出残液、グルタチオン抽出残液その他がある。

酵母菌体は生菌体でも使用可能であるが、酵素作用を受けやすくするため予め熱処理したものが望ましい。熱処理は50～80℃程度、好ましくは60～70℃程度、の温度で3～60分間、好ましくは5～20分間、菌体を水性スラリー状態で加熱することからなる。

酵母の酵母エキス抽出残液は抽出工程から得られたままのものを使用することができるが、予じめアルカリ処理をしたものが好ましい。酵母グルカン収量が增大するからである。アルカリ処理は、抽出残液をpH

(11) 糖の組成

100チグルコースよりなる。

(12) 糖の結合様式

β -1, 3-グルカナーゼにより分解されることから、主として β -1, 3-グルコシド結合である。

(13) 特異的性質

本物質の水性懸濁液を75℃以上に加熱すると溶解となり、これを冷却するとグル化凝固する。グル化は熱可逆的である。

本発明による酵母グルカンは常温の水に不溶である。しかし、これに α -ハロゲン置換脂肪酸またはその誘導体を反応させて、カルボキシアルキル化誘導体にすれば、水溶性となる。水溶性誘導体に変換しても、酵母グルカンとしての生理活性は維持されている。

添附票1図は、本発明で使用する酵母グルカンの2.4多量性ソーダ水溶液中の紫外線吸収スペクトルを模写したものである。票2図は本発明で使用する酵母グルカンの赤外線吸

10以上、好ましくはpH 12～13、のアルカリ水溶液中で、5～40℃程度の温度、好ましくは室温付近で5～120分間程度、好ましくは5～60分間程度、攪拌することからなる。

酵母細胞膜原料は、上記のような前処理とは別にあるいは同時に、あるいは酵素反応等において酵素作用の促進物質である水溶性亜硫酸塩もしくは8日化合物、例えば2-メルカプトエタノール、システイン等、による処置に附させることが好ましい。この処置は上記のような処理と同時に進行することが便利である。

酵母としては酵母細胞膜溶解酵素により溶解され得る酵母品種のすべてを使用することができる。例えば、具体的にはサツカロマイセス(Saccharomyces)属の酵母、その他、いわゆるパン酵母、ビール酵母、清酒酵母等がある。

(12) 酵母細胞膜溶解酵素

本発明方法に使用する酵母細胞膜溶解酵素はたとえばアースロバクター (Arthrobacter) の生産する酵素 (特公昭47-32674号及び特公昭48-2790号各公報参照) 及びオエルスコビア (Oerskovia) の生産する酵素 (ジャーナル・オブ・バクテリオロジー、第111巻、第821頁、1972年、J. W. Mann ら著) である。酵素は、少なくとも部分精製されたものが好ましい。具体的には、市販品としてアースロバクターの酵素である「ザイモリエイス」(登録商標) がある。

(3) 酵素反応

酵母細胞膜原料の適当濃度の水性懸濁液、たとえば5~30%懸濁液に、酵素を適量添加し、攪拌する。その際、酵素作用促進物質として、前記の亜硫酸塩またはメルカプトエタノール等をこの反応系に加えても良い。反応温度は使用酵素の作用範囲内の適当値、たとえば20~60℃、好ましくは30

~50℃、程度である。反応系のpHは使用酵素の適当値、たとえば6.0~11.0、好ましくは7.0~10.0、である。反応時間は使用酵素量に依存する。通常、反応中に酵母グルカンが遊離してくるために反応系の粘度上昇が認められるので、反応系の粘度が最高に達した時に反応を中止するのが好ましい。それ以上に過剰に反応時間を延長すると、酵母グルカンの遊分解が起つて収量の低下をきたし、極端な場合には目的の酵母グルカンを得ることができなくなる。所定の反応時間経過後、反応物を遠心分離その他の手段で不溶物と可溶物とに分離し、不溶物を良く水洗する。この不溶物を水に懸濁し、系のpHを適当なアルカリ(たとえば水酸化ナトリウム)で12以上に調整し、(あるいは、pH 12以上のアルカリ水溶液に直接この不溶物を懸濁し)、適当温度、たとえば室温、で5~20分間攪拌して酵母グルカンを溶解させ、遠心分離、伊過等の手

段を用いて不溶物を除去して、透明な溶液を得る。この溶液に攪拌下に適当な酸(たとえば塩酸)を添加してpHを7~9.0に低下させると酵母グルカンが析出する。析出した酵母グルカンを水洗し、脱水、乾燥すれば、本発明の酵母グルカンが得られる。この標品について上記の溶解-析出操作を繰返せば、精製品が得られる。

3. カルボキシアルキル化

グルカンのカルボキシアルキル化は公知であり、種々の方法で行えばよい。

一例をあげると、酵母グルカンをイソプロパノールに懸濁させ、高濃度のアルカリ溶液、たとえば苛性ソーダ溶液、を加え、更に、 α -ハロゲン置換脂肪酸(ハロゲンは塩素および臭素が特に適当であり、脂肪酸は0.~10.のもの、特に酢酸が適当である)またはその誘導体(たとえば、アルカリ金属ないしアンモニウム塩、エステルその他)を加えて20~60℃程度の温度で、1~4時間

程度攪拌しながら反応させればよい。反応後は、沈澱物を集め、水に溶解してpHを適当な酸(たとえば酢酸)で中和した後、不溶物を除去し、エタノール等の有機溶媒を加え、沈澱物を集め、乾燥させる。

4. 制癌剤

(1) 制癌作用

腫瘍としてザルコーマ180の腹水内細胞100万個を4d系雄性マウス皮下に接種し、翌日より隔日に本物質を1~25mg/kgの投与量で腹腔内に10回投与する。腫瘍細胞接種5週間後に動物を殺し、腫瘍を摘出して重量を測定し、対照群のそれと比較して、腫瘍発育阻止率を算出した。その結果によると、この投与量にて阻止率は70~80%を示した。

この作用は、本物質のカルボキシメチル化による水溶性誘導体においても失なわれない。

(2) 剤型

前記の酵母グルカンを有効成分とする本発明の制癌剤は、合目的な任意の剤型でありうる。酵母グルカンが粉末である場合には、散剤、適当な賦形剤による錠剤、液体分散媒に分散させた液剤、その他が適当である。酵母グルカンが水性ゲルである場合は、寒天状の剤型が可能であり、またこの寒天状水性ゲルを胃酸崩壊性カプセルに収容した剤型も可能である。

酵母グルカンが水溶性カルボキシアルキル化誘導体の形の場合には、水溶液による液剤が可能である。

本発明による制癌剤は、その剤型に応じて経口、注射、経直腸その他合目的な投与形態により投与することができる。

(3) 投与量

具体的な投与量は病状、患者の状態その他を考慮して医師が決定すべきであるが、一般的にいえば1日当り20~200mg/kg

体重程度である。

(4) 急性毒性

マウスによる急性毒性は、下記の通りである。

マウスは、dd系雄性、5週令、体重20~25gのものをを用いた。投与経路は、経口および腹腔内投与の二経路であつた。本発明酵母グルカン投与後、7日間にわたつて死亡の有無ならびに一般症状の観察を行なつた。その結果、技術的に投与可能な最大投与量においても全く死亡例は認められず、LD₅₀は経口投与において5,000 mg/kg以上、腹腔内投与において3,000 mg/kg以上と推定された。

B. 実験例

(1) 酵母グルカンの製造

ビール酵母の酵母エキス抽出残渣200gを約1.5リットルの約1Nの苛性ソーダ溶液に懸濁させ、室温で30分間攪拌後、亜硫酸ソーダ25.6gを添加溶解し、塩酸によ

りpH 8.0とし、全量を2リットルとした。「サイモリエイス-60000(商品名)」500mgを添加し、38℃で3時間攪拌しながら反応させた後、反応物を遠心分離して、不溶物を得た。不溶物を十分に水で洗浄後、水に懸濁させ、3Nの苛性ソーダ溶液を用いてpH 12.8とし、室温で10分間攪拌後、遠心分離を行なつて、濁りのある上澄液を得た。上澄液を珪藻土を用いたろ過に付し、得られた透明な母液を塩酸にてpH 8.0として酵母グルカンを析出させ、遠心分離によつてこれを集め、水で十分に洗浄し、再び水に懸濁させる。3Nの苛性ソーダを用いてpH 13として酵母グルカンを溶解させ、遠心分離により少量の不溶物を除去後、塩酸によりpH 8として酵母グルカンを析出させ、水で充分洗浄後、水に懸濁させ、10分間煮沸し攪拌しながら冷却し遠心分離によつて酵母グルカンを集め、真空乾燥した。収量は18.5gであつた。

(2) カルボキシメチル化酵母グルカンの製造

上記のようにして得られる酵母グルカン12gを320mlのインプロパノールに懸濁させ、激しく攪拌しながら30%苛性ソーダ溶液32mlを添加し、更にモノクロル酢酸14.4gを徐々に添加し、40℃で2時間攪拌しながら反応させた。反応後、反応物を貯蔵し、上澄液を捨て、水を500mlになるまで加え、良く攪拌して反応生成物を溶解した。酢酸を用いてpH 6.8に調整し、珪藻土ろ過を行なつて、透明な母液を得た。母液に3倍量のエタノールを加え、遠心分離により沈澱物を集め、沈澱物を水に溶解し、遠心分離により少量の不溶物を除き、8倍量のエタノール及び少量の飽和食塩水を加えて沈澱を生成させる。沈澱をガラスろ過漏斗に集め、エタノール、エーテルで順次洗浄後、乾燥させた。収量は13.6gであつた。

(3) 制癌作用試験

5週令のdd系雄性マウスの左鼠蹊部皮

第1表 本発明物質の

制癌作用

| 試 料 | 投 与 量 (mg/kg/日) | 腫瘍増殖 阻止率(%) |
|-----------------|--------------------|----------------|
| 酵母グルカン | 0.2 | 62.6 |
| | 1.0 | 75.1 |
| | 5.0 | 78.4 |
| | 25.0 | 78.0 |
| カルボキシメ チル誘導体 | 0.2 | 46.7 |
| | 1.0 | 80.5 |
| | 5.0 | 78.1 |
| | 25.0 | 72.9 |
| 市販制癌剤* | 0.2 | 63.3 |
| | 1.0 | 69.8 |
| | 5.0 | 72.5 |
| | 25.0 | 75.7 |

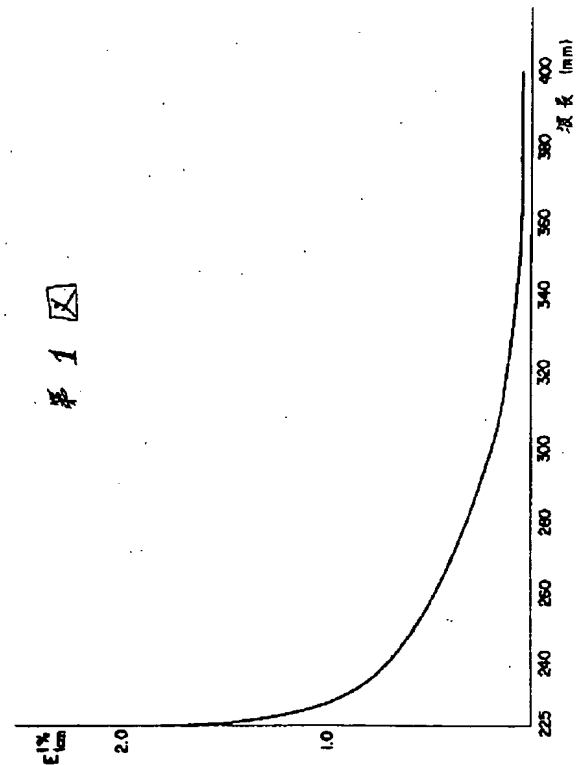
* カワラタケから得られたものといわれて
いるもの

下にザルコーマ180の腹水内細胞100万
個を移植し、24時間後より連日10日間にわ
たり第1表に示す各薬物を各投与量で1日
1回腹腔内に投与した。なお動物は薬物投
与群にそれぞれ1群10匹を、対照群には20
匹を用い、薬物は生理食塩水に懸濁もしくは
溶解して投与し、対照群には同容量の生
理食塩水を同様に投与した。腫瘍移植後、
85日目に全動物を殺し、癌腫瘍を摘出して、
その重量を測定した。結果を第1表に示す。

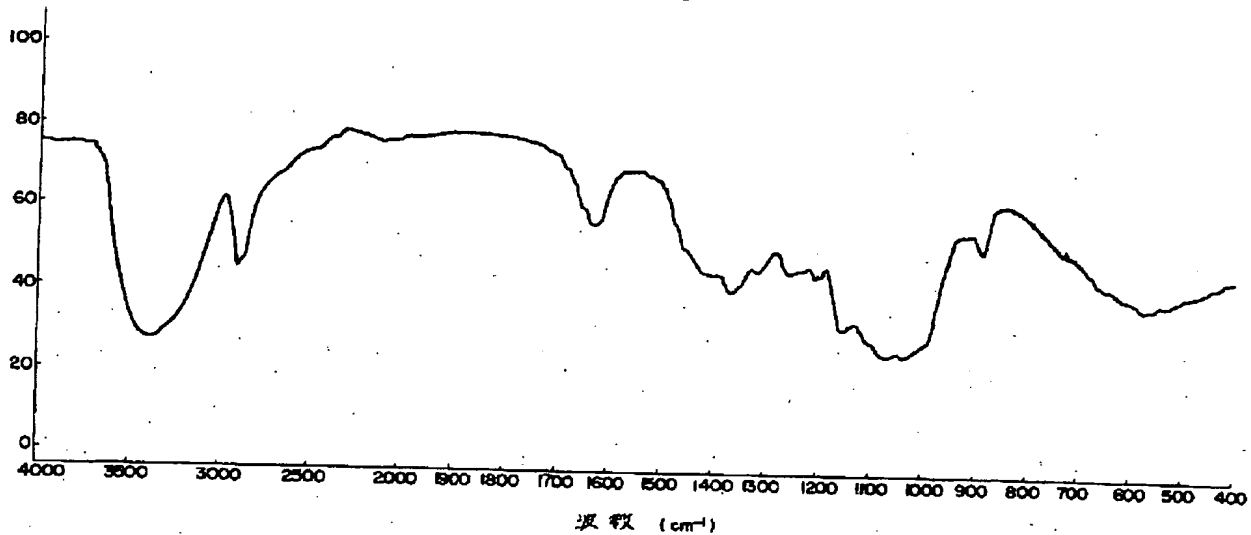
図面の簡単な説明

第1図は本発明で使用する酵母グルカンの紫外
線吸収スペクトル、第2図は本発明で使用する酵
母グルカンの赤外線吸収スペクトル、をそれぞれ
模写したものである。

出願人代理人 猪 股 清



第 2 図



手 続 補 正 書

昭和 54 年 5 月 14 日

特許庁長官 齋 谷 孝 二 殿

1、事件の表示

昭和 53 年 特 許 願 第 4 5 1 4 3 号

2、発明の名称

制 癌 剤

3、補正をする者

事件との関係 特許出願人

株式会社 武蔵工業株式会社

4、代理人

(郵便番号 100)
東京都千代田区丸の内三丁目2番3号
〔電話 東京(211) 2321 人代表〕

4230 弁 理 士 猪 股 清

5、補正命令の日付

昭和 年 月 日
(発出後 昭和 年 月 日)

6、補正によりする発明の数

7、補正の対象

図 面

8、補正の内容

図面を、添付のものの通りに補正する。
(添付) 特許庁

